

Interakcije receptora i liganda pod lupom spektroskopije NMR

KUI – 8/2008

Prispjelo 24. siječnja 2007.

Prihvaćeno 5. srpnja 2007.

P. Tepes^{a,} i P. Novak^b*^a Laboratorij za geokemiju okoliša, Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hallerova aleja 7, 42 000 Varaždin, Hrvatska^b Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvátovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Spektroskopija NMR danas je metoda odabira za izučavanje interakcija biomolekula s potencijalnim ligandima, što predstavlja jedan od glavnih preduvjeta za dizajn lijekova na racionalnim osnovama. Najvažniji doprinos spektroskopije NMR dizajnu lijekova do prije nekoliko godina bilo je rješavanje 3D strukture proteina. Uz to što nam spektroskopija NMR daje podatke o 3D strukturi slobodnih proteina kao sirove podatke za molekulsko modeliranje vezanja liganada, NMR nam izravno može dati važne eksperimentalne informacije o samim biološki važnim kompleksima. Za razliku od rendgenske strukturne analize spektroskopijom NMR može se proučavati dinamika kako samih velikih biomolekula tako i dinamika kompleksa biomolekula i potencijalnih liganda. Tako je moguće proučavanjem promjena u NMR parametrima prilikom vezanja kvalitativno (npr. „SAR by NMR”) i kvantitativno (promjene kemijskih pomaka i vremena relaksacije, difuzijski NMR eksperimenti itd.) odrediti sklonosti vezanja liganada. Također je moguće i uporabom metoda kao što su npr. tr-NOESY, STD, WaterLOGSY i dr. odrediti i mjesto vezanja, odnosno dobiti informacije o konformaciji proteina, liganda ili njihovog kompleksa te epitope, tj. skupine na ligandu koje su u neposrednoj blizini mjesta vezanja. U posljednje vrijeme razvijen je velik broj tehnika NMR za izučavanje interakcija ligand-receptor, no u ovome radu opisane su samo neke od njih te su pokazane njihove prednosti i nedostaci.

Ključne riječi: *Nuklearna magnetska rezonancija, receptor, ligand, kompleks receptor-ligand, NMR parametri, struktura, sklonost vezanju, aktivno mjesto, konstanta disocijacije, difuzija, NOE, epitopi*

Uvod

Međudjelovanje molekula određuje središnju ulogu u procesima molekulskog prepoznavanja, kao npr. kod nastajanja kompleksa proteina s drugim proteinima (u procesu prenošenja signala), s malim molekulama (interakcije enzim-supstrat, protein-lijek) i s nukleinskim kiselinama (interakcije protein – RNA/DNA, transkripcijski faktori s DNA i dr.). Biološki mehanizmi gotovo se uvijek temelje na više ili manje specifičnim molekulskim interakcijama, te je poznavanje tih interakcija preduvjet za suvremen pristup dizajniranju lijekova. Pomoću spektroskopije NMR moguće je dobiti potrebnu informaciju o interakcijama na raznim razinama, od kvalitativne indikacije o nastajanju kompleksa, do 3D strukture i podataka o kinetici nastajanja kompleksa.^{1,2}

Najvažniji doprinos spektroskopije NMR dizajnu lijekova do prije nekoliko godina bilo je rješavanje 3D strukture proteina. Prva struktura proteina dobivena NMR-om objavljena je 1985. godine.^{3,4} Danas se određivanje strukture proteina NMR-om većinom provodi pomoću izotopno obogaćenih uzoraka proteina koji su dobiveni overekspresijom u genetički modificiranim bakterijama. Proteini molekulске mase 10–12 kDa tako se jednoliko obogaćuju stabilnim izotopom ¹⁵N, dok se veći proteini uniformno obogaćuju s izotopima ¹⁵N i ¹³C. Za proteine veće od 20 kDa za uspješnu

asignaciju signala potrebno je i obogaćivanje deuterijem. Današnjim metodama obogaćivanja i novim tehnikama NMR, koje su u stalnom razvitku moguće je riješiti strukture proteina veličine 30–40 kDa, a daljnji razvoj tehnika te NMR instrumenata obećavaju da će veličina proteina čija se struktura može odrediti spektroskopijom NMR sve se više povećati.^{5,6} Za razliku od rendgenske strukturne analize teško je govoriti o rezoluciji strukture proteina dobivenih tehnikama NMR zbog različitih računskih metoda kojima dobivamo strukturu iz eksperimentalnih podataka. Prihvaćeno je da se struktura riješena iz NMR podataka može usporediti sa strukturom dobivenom rendgenskom strukturnom analizom rezolucije < 0,2 nm. Uz 3D strukturu proteina, spektroskopija NMR za razliku od rendgenske strukturne analize nezaobilazna je metoda za proučavanje dinamike proteina,⁷ odn. dinamike interakcija protein-ligand, zbog toga što te interakcije uključuju promjenu konformacija obje vrste koje sudjeluju u interakciji. Specifičnost vezanja određenog liganda npr. ovisi o fleksibilnosti aktivnog mjesta proteina,⁸ a fleksibilnost proteina i/ili liganda ima utjecaj na termodinamiku i kinetiku nastajanja kompleksa. NMR se pokazala kao dragocjen izvor podataka o lokalnoj molekulskoj dinamici mjereći promjene NMR parametara u različitim dijelovima vremenske skale.^{9,10}

Uz to što nam spektroskopija NMR daje podatke o 3D strukturi slobodnih receptora kao sirove podatke za molekulsko modeliranje vezanja liganada, NMR nam izravno

* Autor za korespondenciju; e-mail: ptepes@gfzv.hr

može dati važne eksperimentalne informacije o samim biološki važnim kompleksima.¹

1. Kvalitativno i kvantitativno određivanje vezanja – promjene u NMR parametrima dopuštaju nam da opazimo i kvantitativno odredimo sklonosti vezanju potencijalnih liganada.
2. Određivanje mjesta vezanja – na temelju promjena u asigniranim NMR-signalima nakon dodatka liganda, može se odrediti mjesto vezanja liganda na protein.
3. Informacije o konformaciji – konformacija kompleksa proteina s ligandom može se usporediti s konformacijom slobodnog proteina odnosno liganda.
4. Informacije o dinamici – uz dodatak statičkoj strukturi, NMR-om se može odrediti i lokalna pokretljivost kompleksa i slobodnih komponenata, što nam daje točniju informaciju o međumolekulskim interakcijama.

U posljednje vrijeme razvijen je velik broj NMR tehnika za izučavanje interakcija ligand-receptor (mjerjenje relaksacije (T_1 , $T_{1\rho}$, T_2), mjerjenje difuzijskih koeficijenta, Tr-NOE, STD, NOE-pumping, Water-LOGSY, promjena kemijskih pomaka (SAR by NMR), no u ovome radu opisane su samo najznačajnije tehnike i one koje se danas najviše primjenjuju.

Skлонost vezanju – “binding affinity”

Ponašanje kompleksa protein-ligand uvelike ovisi o njihovim termodinamičkim i kinetičkim svojstvima (odn. konstantama disocijacije i omjeru brzina vezanja i otpuštanja liganda („on/off“)). Odabir NMR tehnike određuju karakteristike sustava koji promatramo i informacija koju želimo dobiti. Koncentracije proteina u otopini često su ograničene topljivošću proteina i agregacijom (i naravno dostupnošću proteina) i obično se kreću oko $c = (0,5 - 5) \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. Za takvu uobičajenu milimolarnu koncentraciju proteina postoje tri podjele u vremenskoj skali interakcija:

1. jako vezanje – konst. disocijacije (K_d) submikromolarna ($K_d < 10^{-6}$ mol L⁻¹)
2. umjereno vezanje – konst. disocijacije (K_d) mikromolarna ($K_d \sim 10^{-6}$ mol L⁻¹)
3. slabo vezanje – konst. disocijacije (K_d) milimolarna ($K_d \sim 10^{-3}$ mol L⁻¹)

Uobičajeno je da kod koncentracija proteina većih od 1 mol L⁻¹ ne dolazi do stvaranja kompleksa s ligandom, pa tako nema ni promjene u NMR parametrima. Za ligande s vrlo velikom sklonošću vezanju („high-affinity ligands“) konstanta disocijacije u području $K_d \sim 10^{-9}$ mol L⁻¹ vodi do zanemarivih koncentracija slobodnog liganda i proteina, pa možemo pretpostaviti da i ligand i protein postoje isključivo u vezanom stanju. Kompleks se tada u otopini ponaša kao jedna stabilna molekula, te njegovi NMR spektri ne pokazuju signale slobodnih vrsta, niti signale izmjene između slobodne i vezane vrste.

U slučaju umjerenog vezanja, pod stehiometrijskim uvjetima, i protein i ligand postoje u otopini i u slobodnom i u vezanom stanju. U ovisnosti o kinetičkoj stabilnosti kompleksa izmjena između slobodne i vezane vrste može utjecati na NMR spektar. Npr. pri konstanti disocijacije od

10^{-3} mol L⁻¹ u stehiometrijskoj smjesi proteina i liganda samo polovina molekula postoji kao kompleks protein-ligand, dok su druga polovina slobodni protein i ligand u sporoj ili brznoj izmjeni s kompleksom u milimolarnom koncentracijskom području. Očigledno je da će pri ovim uvjetima izgled NMR spektra biti znatno složeniji nego u prvom slučaju. Međutim, za mikromolarne konstante disocijacije kompleksa potpuno kompleksirano stanje proteina možemo postići dodatkom umjerenog suviška (10 do 100 puta) liganda. Signali suvišne komponente tada se mogu iz spektra filtrirati tehnikama izotopnog filtriranja. Zbog toga što su najčešći kemijski i biološki procesi u prirodi upravo takvi, odn. uključuju dinamičku ravnotežu između slobodnog i vezanog stanja komponenata, rezultat je da se takvi kompleksi često ne mogu kristalizirati, pa je tada spektroskopija NMR metoda odabira za proučavanje strukture kompleksa.

U slučaju slabo vežućih liganada ne možemo potpuno pomaknuti ravnotežu u korist nastajanja kompleksa dodatkom suviška liganda. Pod uvjetima NMR-a vrlo mali dio molekula postoji u kompleksiranom stanju onemogućavajući uobičajene tehnike za određivanje 3D strukture. No pomoću nekih specifičnih NMR tehnika moguće je ipak prikupiti mnoštvo informacija o kompleksu kao što su indikacije o promjeni konformacije, mape epitopa i dr.

Izotopno filtriranje

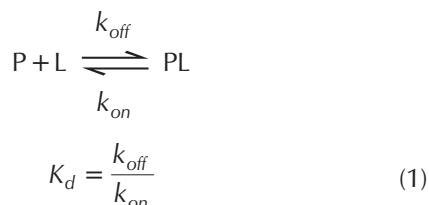
Izotopni filtri znatno pomažu ulogu u pojednostavljivanju spektara u sustavima koji su bez njih presloženi za rješavanje.¹¹ Uporaba izotopnih filtara omogućuje nam proučavanje samo jedne komponente sustava, što uvelike olakšava asignaciju i rješavanje 3D strukture velikih kompleksa (protein-protein, protein-nukleinska kiselina, itd.). Također, izotopni filtri su važni kod umjerenog vezanja, kada u otopini imamo suvišak jedne komponente. NMR signali tada se mogu filtrirati, rezultat čega je spektar samo onih komponenti koje dolaze od potpuno kompleksirane vrste, bez smetnje slobodnih vrsta.

U standardnom postupku samo jedna komponenta obogati se sa stabilnim NMR-aktivnim izotopom (uobičajeno ¹⁵N i/ili ¹³C), a ostale komponente sustava ostaju pri prirodnoj zastupljenosti tog izotopa. NMR-aktivni izotopi nam tada služe za asignaciju kemijskih pomaka pomoću 2D i 3D heteronuklearnih korelacijskih NMR spektara. Zbog toga što te tehnike zahtijevaju ¹⁵N i ¹³C obogaćene jezgre, samo obogaćen dio kompleksa će pokazivati signale u NMR spektru, a ostale komponente se neće vidjeti u spektru zbog vrlo male prirodne zastupljenosti tih jezgri (¹⁵N – 0,3 %, ¹³C – 1,1 %).^{12–15} Alternativno, signali obilježene ili neobilježene komponente mogu se selektirati pomoću filtra u pulsnom slijedu, te tako dobiti informacije o intermolekulskim NOE-kontaktima. Za supresiju ¹H NMR signala može se provesti i selektivno obilježavanje deuterijem jedne komponente iz kompleksa što tada uklanja tu komponentu iz protonskih NMR-spektara.⁵

Vremenska skala izmjena za NMR-parametre

Kompleks protein-ligand u otopini koegzistira u ravnoteži sa znatnim količinama slobodnog proteina i/ili slobodnog li-

ganda, što ovisi o relativnim množinskim odnosima,¹⁶ osim za ligande s velikom sklonosti vezanju. Konstanta disocijacije K_d općenito se može prikazati kao omjer koeficijentata vezanja (k_{on}) i otpuštanja (k_{off}) liganda (L):



gdje je vrijeme života kompleksa protein-ligand obrnuto proporcionalno brzini otpuštanja (k_{off}) liganda.

Ako se pretpostavi da je k_{on} difuzijski ograničena (odn. oko $10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$), vremena života kompleksa mogu se prosuditi za različite sklonosti vezanju.

Tablica 1 – Sklonosti vezanju liganda i vremena života kompleksa¹⁶

Table 1 – Binding affinities and lifetimes of the complex species¹⁶

K_d	k_{off} / s^{-1}	Vrijeme života kompleksa / s Lifetime of complex / s
$10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	0,1	10
$10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	100	0,01

Tablica 2 – Vremenska skala za učinke izmjene u eksperimentima NMR¹⁶

Table 2 – Time scale for exchange effects of NMR parameters¹⁶

Veličina Quantity	Mjerno područje Range	Razlika između slobodnog i vezanog stanja Difference between free and bound state	Vrijeme života pri umjerenoj izmjeni Lifetime at intermediate exchange
Kemijski pomak Chemical shift	0–10000/Hz	100–1000/Hz	10^{-3} – 10^{-2} /s
Skalarna sprega Scalar coupling	0–200/Hz	1–10/Hz	0,1 – 1/s
NOE NOE	0–5	0,1–5	0,2–10
Relaksacijska vremena T_1	0,1–10/s	0,1–10/Hz	0,1–10/s
Relaxation times T_2	1–100/s	1–50/Hz	0,02–1/s

Da bismo izmjerili NMR parametre (npr. frekvencija) zasebno za svako stanje (odn. slobodno ili vezano stanje), vrijeme života određenog stanja mora biti znatno dulje od obrnuto proporcionalne razlike vremena života slobodnih vrsti. Tako, da bismo izmjerili kemijske pomake slobodnih i vezanih vrsti odvojeno (dva skupa NMR signala), njihova vremena života moraju biti u omjeru od stotinjak milisekundi do sekunde (spora izmjena). S druge strane ako su individualna vremena života u submilisekundnom omjeru (brza izmjena), tada u NMR spektru vidimo samo jedan

skup signala koji odražava uprosječene kemijske pomake slobodne i vezane vrste (koji ovisi o njihovim relativnim koncentracijama).

Osim liganada s velikom sklonošću vezanja s nanomolarnim K_d vrijednostima, vremena života kompleksa protein-ligand obično se nalaze u milisekundnom režimu. Iz tablice 2 može se vidjeti da su najosjetljiviji NMR parametri kemijski pomak i vrijeme relaksacije T_2 (transverzalno ili spin-spin). Tr-NOE-mjerenja najviše se koriste pri brzom izmjeni.

Mjerenje sklonosti vezanju pomoću spektroskopije NMR

Postoje dva pristupa u izučavanju interakcija ligand-receptor, a to su:

- 1) mjerenje promjena NMR parametra biomolekule (SAR by NMR)
- 2) mjerenje promjena NMR parametra liganda:
 - a) promjena kemijskog pomaka (titracije)
 - b) relaksacijske tehnike (T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$)
 - c) difuzijske tehnike
 - d) tehnike prijenosa magnetizacije (Tr-NOE, STD, NOE pumping, WaterLOGSY)

U ovome radu bit će opisane neke od metoda u kojima se primjenjuju promjene u NMR parametrima biomolekule, te neke koje promatraju promjene parametara liganda.

Metoda odnosa strukture i svojstva pomoću spektroskopije NMR („SAR by NMR“)

„SAR by NMR“^{17–19} je brza metoda probira baze potencijalno biološki aktivnih spojeva, u kojoj se male organske molekule vežu za protein, identificiraju, optimiziraju i vežu zajedno da bismo dobili ligand s velikom sklonošću vezanju.

U prvom stupnju metode, biblioteka liganada male molekulske mase probire se radi identifikacije molekula koje se vežu na protein. Vezanje se utvrđuje promjenom kemijskog pomaka ^{15}N ili ^1H jezgre u 2D ^{15}N -HSQC NMR spektru nakon dodatka liganda u otopinu proteina obilježenog izotopom ^{15}N . Takvi spektri dobivaju se vrlo brzo, omogućavajući probir velikog broja malih molekula u relativno kratkom vremenu. Kada se odredi ligand s najboljim vezanjem, analozi te molekule probiru se radi poboljšanja vezanja na aktivno mjesto. Nadalje, promatra se i vezanje liganada na sekundarna mjesta na proteinu, koja su u relativnoj blizini aktivnog mjesta. Iz analize kemijskih pomaka identificira se sekundarno aktivno mjesto. Kada se tako selektira ligand s najvećom sklonošću vezanja za sekundarno aktivno mjesto, kompleks proteina s oba liganda asignira se pomoću tehnika NMR-a ili rendgenske strukturne analize. Na temelju dobivenih strukturnih elemenata, sintetizira se novi ligand, koji se sastoji od povezanog primarnog i sekundarnog liganda radi dobivanja novog još boljeg liganda s vrlo velikom sklonošću vezanju.

Prednosti ove metode su u tome što je vrijeme snimanja NMR kratko (danas su poznate tehnike u kojima je moguće dobiti NMR spektar u manje od minute), ovisno o tehnici snima se 10 do 100 liganada u jednom eksperimentu, što

omogućuje probir 1 000 do 10 000 liganada dnevno. Zbog toga što se u spektrima prate ^{15}N signali izotopno obilježeniog proteina signal neobilježenog liganda je filtriran, pa se zbog toga vezanje može odrediti i pri velikim koncentracijama liganada, što je prednost pred uobičajenim fluorimetrijskim ili kolorimetrijskim mjerenjima gdje suvišak liganda uvelike povećava pozadinski šum i onemogućava detekciju vezanja.

Ograničenja, s druge strane, su topljivost uzoraka, veličina proteina (mogu se rabiti mali proteini (30–40 kDa)), velike količine proteina (do 200 mg po eksperimentu), slaba osjetljivost NMR-a (uklanja se uporabom krio-tehnologije).

Isto tako, za uspješnu analizu potrebno je poznavati strukturu proteina, mjesto vezanja (aktivno mjesto) te vrstu interakcije receptor–ligand koja će se izučavati.

Eksperimenti kao što je metoda odnosa strukture i svojstva pomoću spektroskopije NMR, odn. „SAR by NMR”¹⁷ najčešće se primjenjuje za kvalitativnu detekciju vezanja liganada.

Promjena kemijskog pomaka – titracije

Sklonost vezanju može se kvalitativno odrediti iz NMR spektara serijom titrationskih eksperimenata. Najčešće, najlakše je pratiti NMR signale (izotopno obilježeniog) proteina uz dodavanje liganda u otopinu u npr. heteronuklearnom 2D korelacijskom eksperimentu (HMQC, HSQC). U slučaju spore izmjene, dodatkom liganda signali slobodnog proteina iščezavaju, a nastaje novi skup signala kompleksiranog proteina. Za kvantitativno određivanje sklonosti vezanju mjere se intenziteti signala slobodne i vezane vrste tijekom titrationskog eksperimenta. Titrationskim NMR eksperimentima mogu se mjeriti konstante disocijacije u mikro i milimolarnom rasponu. Donju granicu u mjerenju iskazuje najmanja moguća koncentracija kompleksa za koju instrument još uvijek ima povoljan odnos signala prema šumu, odn. omjer S/N (signal to noise).

Nedostatak te metode je što je pojavom novog skupa signala moguće preklapanje skupova signala vezane i slobodne vrste i nemogućnost točne asignacije i kvantifikacije intenziteta signala.

Prilikom brze izmjene opaža se samo jedan skup signala proteina, te se kemijski pomak mijenja od onoga slobodne vrste prema vezanoj. Zbog toga što imamo postupan prijelaz kemijskih pomaka, olakšana je asignacija signala vezane vrste ako su signali slobodnog proteina prije toga uspješno assignirani. Analizom titrationske krivulje moguće je odrediti konstantu vezanja.^{11,20–22} Pri brzom izmjeni možemo koristiti NMR spektre s lošim S/N-omjerom zbog toga što eksperimenti ne zahtijevaju točno određivanje intenziteta.

Difuzijski NMR eksperimenti

Translacijska difuzija je miješanje molekula ili atoma zbog nasumičnog termičkog gibanja.

Difuzijski eksperimenti mogu se upotrijebiti za kvantitativno i kvalitativno određivanje sklonosti vezanja liganada.^{23–30}

Metoda koja se temelji na difuziji u prednosti je prema drugima zbog toga što je brza (rezultati se mogu dobiti u sekundi ili minuti), jednostavna i selektivna, što omogućava istodobnu analizu mnoštva liganada.

Koeficijenti difuzije obrnuto su proporcionalni promjeru solvataranom molekule (d) i viskozitetu otapala (η) prema Stokes–Einsteinovoj jed. (2):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (2)$$

gdje je k Boltzmanova konstanta, a T apsolutna temperatura. Jednadžba pretpostavlja da je solvatarana molekula sferna. Iz jed. (2) proizlazi da manja molekula (odn. ona koja ima manji solvatarani promjer) ima veći koeficijent difuzije, dok veća molekula ima manji koeficijent difuzije.

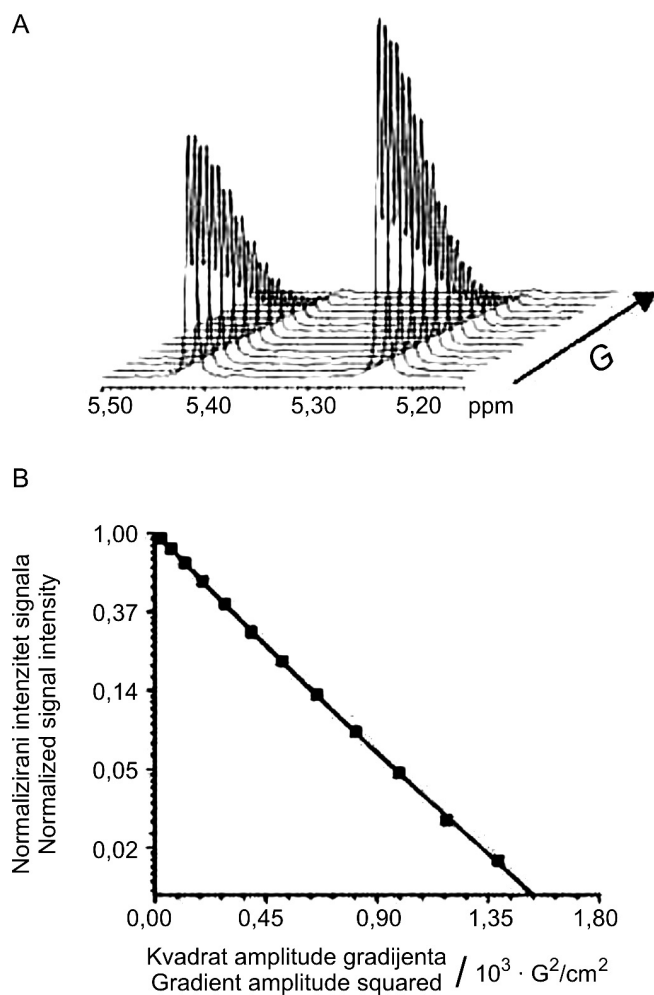
Tako se vežući ligandi mogu lagano razlikovati od nevežućih zbog znatnog povećanja promjera liganda vezanjem na protein, što se očituje u smanjenju koeficijenta difuzije.

Mjerenja koeficijenta difuzije moguća su uporabom impulsnih sljedova koji upotrebljavaju gradijente magnetskog polja („pulse-field gradients”, PFG).³¹ Gradijenti magnetskog polja dobivaju se pomoću tzv. gradijentnih zavojnica u NMR probi. Kad je gradijent primijenjen, narušava se homogenost statičkog magnetskog polja i ono tada ovisi o položaju spinova unutar uzorka. Snaga gradijenta varira linearno po duljini uzorka u NMR cjevčici, a definirana je produktom amplitude gradijenta (G), duljine trajanja gradijenta (δ) i žiromagnetskog omjera (γ). Pulsevi gradijenata omogućavaju praćenje položaja jezgri prije (vrijeme kodiranja gradijenta) i nakon (vrijeme dekodiranja gradijenta) eksperimentalnog vremena difuzije (Δ). Učinkovitost dekodiranja ovisi o tome koliko je uprosječena longitudinalna difuzija molekule s obzirom na smjer polja gradijenta tijekom Δ . Što je veći pomak zbog difuzije, slabije je dekodiranje gradijenta. Npr. difuzija malog liganda u otopini dat će veći pomak u prostoru tijekom Δ u usporedbi s velikim proteinom. Zbog toga će ligand dobiti značajno različite kodirajuće i dekodirajuće fazne kutove, što vodi smanjenju signala liganda jer magnetizacija nije do kraja refokusirana. Tijekom difuzijskog NMR eksperimenta intenzitet signala, I , eksponencijalno će se smanjivati s kvadratom površine gradijenta prema jed. (3) (slika 1a):

$$I = I_0 \exp[-D(\gamma \delta G)^2 (\Delta - \delta / 3)] \quad (3)$$

U jed. (3) I_0 je intenzitet signala bez primijenjenog magnetskog polja gradijenta. Brzina smanjenja eksponencijalne krivulje za ligand i protein proporcionalna je njihovim koeficijentima difuzije. Logaritmirajući obje strane jed. (3) dobivamo linearnu jednadžbu (slika 1B) i tada se D izračunava iz nagiba pravca.

Mjerenja s visokom osjetljivošću omogućavaju određivanje koeficijenta difuzije čak i molekula sa sličnom molekulskom masom i 3D strukturom ako su njihove rezonancije odijeljene u NMR spektru. Ukoliko rezonancije nisu odijeljene, alternativa je NMR tehnika nazvana DOSY (diffusion-ordered spectroscopy), koja nam daje 2D spektar u kojem su na horizontalnoj osi kemijski pomaci, a na vertikalnoj izračunati koeficijenti difuzije.



Slika 1 – Učinak amplitude gradijenata na NMR signale.²³ (A) Povećanjem amplitude gradijenata atenuacija signala anomeranog protona ($5,23 \cdot 10^{-6}$) glukoze-6-fosfata (G6F) brža je od atenuacije signala protona na $5,41 \cdot 10^{-6}$ zbog njegove brže difuzije. (B) Podaci prikazani kao prirodni logaritam pokazuju linearnu ovisnost NMR podataka prema jed. (3). Difuzijski koeficijent može se odrediti iz nagiba pravca.

Fig. 1 – Effect of gradient amplitude on NMR resonances in a diffusion experiment.²³ (A) As the gradient amplitude is increased, the attenuation of the glucose-6-phosphate (G6P) anomeric proton ($5,23 \cdot 10^{-6}$) resonance is faster than the attenuation of the sucrose anomeric proton ($5,41 \cdot 10^{-6}$) due to its faster diffusion. (B) The data displayed on a natural log scale to show the NMR data fit the linear version of eq. (3). The diffusion coefficient can be determined from the slope of the line.

Konstanta vezanja dobivena uporabom PFG-NMR difuzijskih eksperimenata za ekvimolarno ravnotežno vezanje liganda na protein izračunava se pomoću jed. (4). Ligand prelazi iz slobodnog [L] u vezano [LP] stanje brzinom (k_{off}) proporcionalnoj termodinamičkoj konstanti disocijacije (K_d) (jed. (4)).

$$LP \rightleftharpoons L + P$$

$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]} \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (4)$$

Koncentracija slobodnog proteina dana je s [P] u jed. (4).

Za ligande u sporom režimu izmjene ravnotežna konstanta disocijacije može se izračunati izravno iz integrala signala vezanog i slobodnog liganda pomoću jed. (5). Integral signala slobodnog liganda (I_f) proporcionalan je koncentraciji slobodnog liganda [L], integral signala vezanog liganda (I_b) proporcionalan je koncentraciji kompleksa protein-ligand [LP]. [P] je koncentracija slobodnog proteina, a definira se kao $[P_{tot} - (L_{tot} \cdot f_b)]$, gdje su $[L_{tot}]$ i $[P_{tot}]$ ukupne koncentracije liganda i proteina, a f_b djelomična koncentracija vezanog liganda. Ukupne koncentracije liganda $[L_{tot}]$ i proteina $[P_{tot}]$ moraju bit poznate kako bi se iz jed. (5) mogla izračunati K_d u režimu spore izmjene liganda:

$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]} = \frac{I_f \cdot \left([P_{tot}] - [L_{tot}] \cdot \frac{I_b}{I_f + I_b} \right)}{I_b} \quad (5)$$

S obzirom da je kemijska izmjena slobodnog i vezanog liganda veoma brza i na vremenskoj skali ^1H kemijskih pomaka i na difuzijskoj vremenskoj skali, određivanje integrala signala u spektru za slobodnu i vezanu vrstu nije moguće. U tom slučaju nam difuzijska NMR mjerenja mogu poslužiti za računanje konstante disocijacije liganda pri brznoj izmjeni.³²

Kada je izmjena brza u NMR-spektru opažamo samo jedan signal s uprosječenim kemijskim pomakom prema jed. (6):

$$\delta_0 = (\delta_f \cdot x_f) + (\delta_b \cdot x_b) \quad (6)$$

gdje je δ_0 prosjek kemijskih pomaka liganda u slobodnom i vezanom stanju, δ_f kemijski pomak liganda u slobodnom stanju, δ_b kemijski pomak liganda u vezanom stanju, x_f množinski udio slobodnog liganda, x_b je množinski udio vezanog liganda, koji tada daje jedan uprosječen koeficijent difuzije prema jed. (7):

$$D_0 = (D_f \cdot x_f) + (D_b \cdot x_b) \quad (7)$$

Ako kombiniramo jed. (4) i (7), dobivamo jed. (8) koja nam daje konstantu disocijacije kompleksa ligand-protein iz PFG-NMR difuzijskih mjerenja:³³

$$K_d = [P_{tot}] \left(\frac{D_b - D_0}{D_0 - D_f} \right) + [L_{tot}] \left(\frac{D_0 - D_b}{D_b - D_f} \right) \quad (8)$$

Konstanta ravnoteže tada se računa znajući ukupne koncentracije proteina $[P_{tot}]$ i liganda $[L_{tot}]$ i mjerenjem koeficijenta difuzije (D_0) za jasno odijeljene NMR signale u spektru otopine liganda i proteina. Neovisna difuzijska mjerenja slobodnog liganda (D_f , korigiranog za viskozitet otopine proteina) i proteina (difuzijski koeficijent vezanog liganda se aproksimira koeficijentom difuzije slobodnog proteina, D_b) također su nužna za izračunavanje K_d .

Taj slučaj pretpostavlja ravnotežni sustav vezanja liganda $r = 1:1$, no u prirodi je moguće da protein ima više aktivnih mjesta, odn. mjesta na koje se ligand može vezati. U tom slučaju eksperimentima PFG-NMR mogu se dobiti relativne sklonosti vezanju, bez znanja o broju mjesta za vezanje liganda.³⁴

Prednost te metode je da izotopno obogaćivanje proteina nije potrebno, omjer između koncentracija liganda i proteina je 1:1 (do 1:10), što iziskuje mnogo manje količine pro-

teina. Metoda je brza, robusna i jednostavna za prilagodbu brojnim sustavima ligand-receptor. Jedan od glavnih nedostataka te metode je njezina slaba osjetljivost.

Mjesto vezanja

Uporaba NMR tehnika nije ograničena samo na detekciju i kvantifikaciju sklonosti vezanja liganada. Zbog korelacija između individualnih signala NMR-a i specifičnog položaja atoma u strukturi molekule moguća je neposredna lokalizacija učinaka prouzročenih vezanjem liganda na aktivno mjesto proteina. Tako se mjesto vezanja na proteinu može odrediti pomoću signala NOE koji dolaze od međumolekulskih kontakata proteina i liganda u NMR spektru. Cjelokupna analiza NOE zahtijeva potpunu asignaciju korelacija NOE proteina i liganda u vezanom stanju. To je moguće samo u režimu spore izmjene odn. jako vežućih liganada. Pri umjerenoj izmjeni u spektru dolazi do pojave signala slobodnih vrsti komplicirajući tako asignaciju NOE korelacija kompleksa. U tom slučaju upotrebljavaju se izotopno obilježene vrste uz upotrebu izotopnog filtriranja u pulsniim sljedovima.

Također, zbog toga što je vrijeme rasta NOE („build-up”) sporo, a obično su tada i vremena miješanja u pulsnom slijedu NOE oko 100 ms, uvjet za nastanak NOE signala je da postoji spora izmjena. Za sve režime izmjene, NOE učinak će biti usrednjen između slobodne i vezane vrste. To je važno za semikvantitativnu analizu NOE korelacija intramolekulskih NOE. Intermolekulski NOE dolaze samo od kompleksiranog stanja, tako da je moguća kvantitativna analiza spektra.

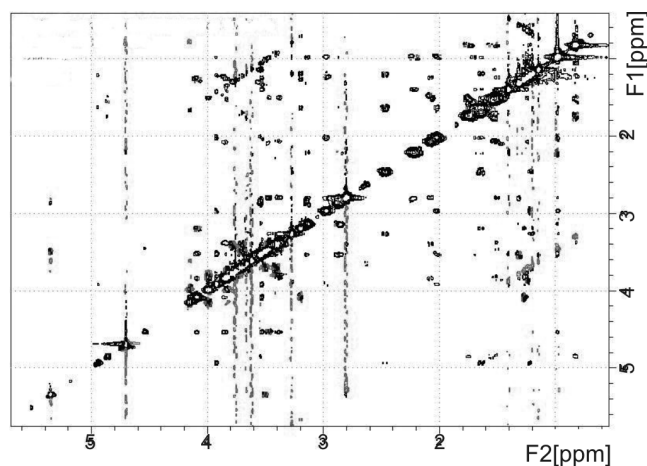
Mnogo brže i jednostavnije metode upotrebljavaju se kada je potrebno samo odrediti aktivno mjesto proteina. Vezanje neke molekule poremeti kemijsku okolinu u mjestu vezanja zbog elektrostatskih i anizotropnih učinaka skupina atoma, te zbog toga može doći do promjene konformacije prilikom vezanja liganda na aktivno mjesto proteina. Rezultat toga je da se kemijski pomaci atoma u aktivnom mjestu mijenjaju. Poznavajući asignaciju tih atoma u nevezanom stanju, lako je preklapanjem dvaju spektara (slobodne i vezane vrste) uočiti promjene u kemijskim pomacima određenih atoma, te ih tako lokalizirati i asignirati.

Relativnu orijentaciju dviju molekula (proteina i liganda), odn. relativnu orijentaciju liganda unutar aktivnog mjesta tada možemo odrediti pomoću dodatnih informacija kao što su prije navedene intermolekulske NOE korelacije i/ili homo- ili heteronuklearne konstante sprega dugog dosega.

Prijenosni nuklearni Overhauserov efekt (tr-NOE)

Prijenosni nuklearni Overhauserov efekt (tr-NOE) je tehnika koja se primjenjuje za dobivanje informacija o vezanoj konformaciji slabo vežućih liganada. Metoda zahtijeva relativno malu sklonost vezanju ($K_d > 100 \text{ mmol L}^{-1}$) i vremena života slobodnih i vezanih liganada od nekoliko stotina milisekundi. U tom slučaju u spektru se vide samo uprosječeni skupovi signala za ligand, a intramolekulski NOE signali također će biti uprosječeni između slobodne i vezane konformacije.

Da bismo kvalitetno interpretirali rezultate vezane konformacije, doprinos signala slobodnog liganda i proteina spektru vezanog liganda mora biti zanemariv. NOE učinak se poništava za korelacijska vremena (t_c) molekula s malim molekulskim masama od oko 1000 Da (što ovisi o temperaturi, viskoznosti otapala i frekvenciji spektrometra). Kada se ligand veže na receptor koji je obično makromolekula, tada je korelacijsko vrijeme vezanog stanja određeno mnogo većom molekulskom masom kompleksa, koji vodi intenzivnijim NOE signalima. Informacije dobivene čak i od vrlo male količine vezanog liganda tada prevladavaju u uprosječenom NOE NMR spektru liganda. U praksi se primjenjuje 10 do 100-struki suvišak liganda, tako da su NMR signali uočljivog intenziteta, a tehnike izotopnog filtriranja za uklanjanje signala slobodnog proteina ili liganda nisu potrebne. Zbog toga što se signali vezane vrste i samog proteina ne vide u spektru, ova metoda može se upotrijebiti za komplekse s vrlo velikim biomolekulama kao što su npr. ribosomi^{35–38} (slika 2). Prilikom dizajna lijekova na racionalnim osnovama dobro je poznavati konformaciju slobodnog^{39–42} i vezanog liganda u otopini kako bi se što uspješnije mogli kemijski derivatizirati ligandi zbog poboljšanja njihove aktivnosti ili fizičko-kemijskih svojstava.



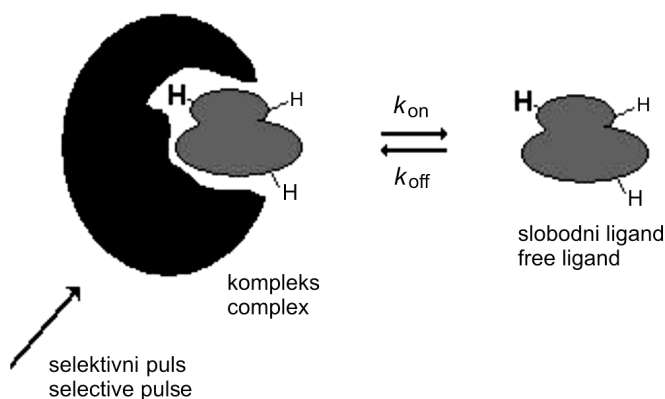
Slika 2 – tr-NOE NMR-spekter azitromicina vezanog u aktivnom mjestu ribosoma *E. Coli*

Fig. 2 – tr-NOE spectrum of azithromycin bound to the active site of *E. Coli* ribosome

Najvažniji nedostatak tr-NOE tehnike je da je ograničena samo na relativno male, slabo vezujuće ligande. Također učinci NOE koji se dobivaju su uprosječeni, iako intenzitetom prevladavaju signali vezane konformacije, ne mogu se odrediti točne interatomske udaljenosti, samo grube prosudbe, tako da se strukturni modeli za interakcije protein-ligand moraju usavršiti dodatnim informacijama ili molekulskim modeliranjem.

Metoda razlike prijenosa zasićenja „Saturation transfer difference” (STD)

Razlika prijenosa zasićenja ili „Saturation transfer difference” (STD)^{43–46} brza je i pouzdana NMR metoda za probir potencijalno aktivnih molekula liganada u smjesi. Temelji se na prijenosu magnetizacije zasićenjem signala proteina i njegovim učinkom na signale liganda (slika 3).



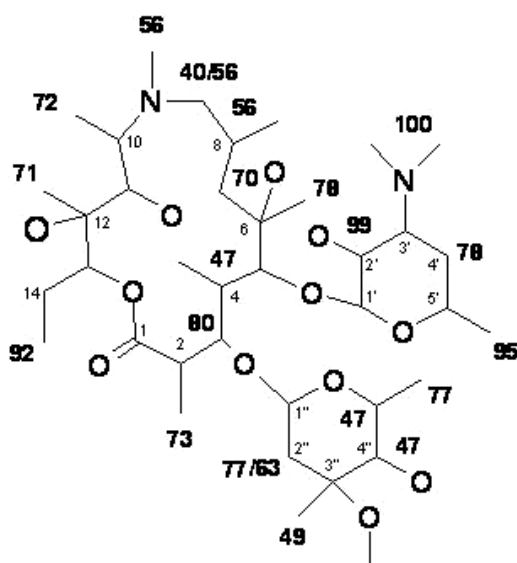
Slika 3 – Grafički prikaz STD učinka

Fig. 3 – Graphic illustration of the STD effect

Makromolekule kao što su proteini imaju veliku mrežu protona čvrsto povezanih interakcijama dipol-dipol. Zasićenje samo jedne rezonancije može prouzročiti brzi prijenos zasićenja preko cijele mreže protona proteina ukoliko je spinska difuzija među atomima proteina učinkovita. Tijekom zasićenja, dolazi do progresivnog prijelaza magnetizacije s jezgri proteina na jezgre liganada, ako se taj ligand veže na protein. Protoni liganada koji su prostorno najbliže protonima proteina najviše se zasićuju, te daju najjači signal u STD-NMR spektru. Protoni liganada koji su prostorno udaljeniji, manje se zasićuju te su njihovi signali slabiji. Zbog toga stupanj zasićenosti individualnog protona liganada ovisi o njegovoj prostornoj udaljenosti od površine proteina i može se učinkovito iskoristiti za određivanje dijelova liganada (mapiranje epitopa) koji se vežu za aktivno mjesto proteina.

Kada kreiramo takvu mapu mjesta vezanja, STD intenzitet signala određen je prema referenci i obično se opisuje tzv. STD faktorom, A_{STD} (shema 1):

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad (8)$$



U danas izrazito zanimljivom i još uvijek nedovoljno istraženom polju biomolekulskih interakcija, NMR ima i dalje će imati velik doprinos njihovom razumjevanju. Razvojem magnetisa s jakim magnetskim poljima ($> 1\text{GHz}$), uporabom kriotehnologija te razvojem novih tehnika koje skraćuju vrijeme snimanja, spektroskopija NMR prerasla je neka-dašnje nedostatke male osjetljivosti i dugotrajnosti snimanja spektara. Zbog svojih prednosti u mogućnosti simuliranja fizioloških uvjeta, brzini snimanja i količini dobivenih informacija, spektroskopija NMR je metoda odabira kada želi-mo izučavati interakcije između receptora i liganda.

ZAHVALA

Autori se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa na financiranju ovih istraživanja u okviru znanstvenog projekta br. 119–1191342–1083, „Interakcije i dizajn bio-aktivnih molekula“.

Popis kratica

List of abbreviations

NMR	– nuklearna magnetska rezonancija – nuclear magnetic resonance
RNA	– ribonukleinska kiselina – ribonucleic acid
DNA	– deoksiribonukleinska kiselina – deoxyribonucleic acid
NOE	– nuklearni Overhauserov efekt – nuclear Overhauser effect
tr-NOE	– prijenosni nuklearni Overhauserov efekt – transferred nuclear Overhauser effect
tr-NOESY	– spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta – nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
HMQC	– heteronuklearna korelacijska spektroskopija NMR koja koristi koherenciju od nula i dva kvanta – heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	– heteronuklearna korelacijska spektroskopija NMR koja koristi koherenciju od jednog kvanta – heteronuclear single quantum correlation
S/N	– omjer signala i šuma – signal to noise ratio
SAR by NMR	– metoda odnosa strukture i svojstva pomoću spektroskopije NMR – structure-activity relationship by NMR spectroscopy
PFG	– gradijenti magnetskog polja – pulse-field gradients
G6F	– glukoza-6-fosfat – glucose-6-phosphate
DOSY	– difuzijski uvjetovana spektroskopija NMR – diffusion-ordered NMR spectroscopy
STD	– razlika prijenosa zasićenja – saturation transfer difference
WaterLOGSY	– interakcija vode i liganda opažena pomoću gradijenta – water-ligand observed via gradient spectroscopy

c	– (množinska) koncentracija, mol L^{-1} – (amount) concentration, mol L^{-1}
D	– koeficijent difuzije, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ – diffusion coefficient, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
d	– promjer molekule – molecule diameter
a	– amplitudni gradijent, m^{-1} – gradient amplitude, m^{-1}
I	– normalizirani intenzitet signala – normalized signal intensity
k	– Boltzmannova konstanta, J K^{-1} – Boltzmann constant, J K^{-1}
k_{off}	– koeficijent otpuštanja, $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$ – remitting coefficient, $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$
k_{on}	– koeficijent vezanja, $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$ – bonding coefficient, $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$
K_{d}	– konstanta disocijacije, $10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ – dissociation constant, $10^{-3} \text{mol L}^{-1}$
ν	– množinski omjer, $n_{\text{lig}}/n_{\text{prot}}$ – amount ratio, $n_{\text{lig}}/n_{\text{prot}}$
T	– temperatura, K – temperature, K
t	– vrijeme, s – time, s
T_1	– relaksacija spin-rešetka ili longitudinalna relaksacija, s – spin-lattice relaxation or longitudinal relaxation, s
$T_{1\rho}$	– relaksacija spin-rešetka u rotirajućem okviru, s – spin-lattice relaxation time in the rotating frame, s
T_2	– relaksacija spin-spin ili transversalna relaksacija, s – spin-spin relaxation or transverse relaxation, s
γ	– giromagnetski omjer – giromagnetic ratio
Δ	– gradijentno vrijeme – gradient time
δ	– kemijski pomak, ppm – chemical shift, ppm
η	– dinamični viskozitet, Pa s – dynamic viscosity, Pa s

Literatura

References

1. U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, NMR spectroscopy in Drug Development and Analysis, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, str. 135–153.
2. O. Zerbe, BioNMR in Drug Research, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
3. M. P. Williamson, T. F. D. Havel, K. Wutrich, J. Mol. Biol. **182** (1985) 295.
4. K. Wütrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley, New York, 1986.
5. C. H. Arrowsmith, Y. S. Wu, Progr. NMR Spectrosc. **32** (1998) 277.
6. V. Dötsch, G. Wagner, Curr. Opin. Struct. Biol. **8** (1998) 619.
7. G. C. K. Roberts, Curr. Opin. Biotechnol. **10** (1999) 42.
8. L. E. Kay, D. R. Muhandiram, G. Wolf, S. E. Shoelson, J. D. Forman-Kay, Nature Struct. Biol. **5** (1998) 156.
9. J. W. Peng, G. Wagner, Biochemistry **31** (1992) 8571.
10. A. G. Palmer III, Curr. Opin. Struct. Biol. **7** (1997) 732.
11. B. J. Stockman, Progr. in NMR Spectrosc. **33** (1998) 109.

12. M. Ikura, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 2433.
13. G. W. Vuister, S. J. Kim, C. Wu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 9206.
14. K. Ogura, H. Terasawa, F. Inagaki, *J. Biomol. NMR* **8** (1996) 492.
15. C. Zwahlen, P. Legaut, S. J. F. Vincent, J. Greenblat, R. Konrat, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 6711.
16. S. E. Harding, B. Z. Chowdry, *Protein–Ligand Interactions: Structure and spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, 2001, str. 383–405.
17. P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 12257.
18. S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **274** (1996) 1531.
19. P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **278** (1997) 497.
20. M. Görlach, M. Wittekind, R. A. Beckman, L. Mueller, G. Dreyfuss, *EMBO J.* **11** (1992) 3289.
21. R. T. Clubb, J. G. Omichinski, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *FEBS Lett.* **338** (1994) 93.
22. M. Wittekind, C. Mapelli, B. T. Farmer II, K. L. Suen, V. Goldfarb, J. Tsao, T. Lavoie, M. Barbacid, C. A. Meyers, L. Mueller, *Biochemistry* **33** (1994) 13531.
23. P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 12257.
24. L. H. Lucas, C. K. Larive, *Concepts in Magnetic Resonance Part A Vol.* **20A(1)** (2004) 24.
25. M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 8930.
26. J. S. Goundaries, A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Chromatogr. B* **725** (1999) 79.
27. M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *Curr. Opin. Drug. Discovery Dev.* **2** (1999) 396.
28. A. Chen, M. J. Shapiro, *Anal. Chem.* **71** (1999) 669A.
29. A. M. Dixon, C. K. Larive, *Appl. Spectrosc.* **53** (1999) 426A.
30. B. Antalek, *Concepts Magn. Reson.* **14** (2002) 225.
31. D. Canet, *Progr. NMR Spectrosc.* **30** (1997) 101.
32. K. L. Gammon, S. H. Smallcombe, J. H. Richards, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 4573.
33. T. S. Derrick, E. F. McCord, C. K. Larive, *J. Magn. Reson.* **155** (2002) 217.
34. M. Liu, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Anal. Commun.* **34** (1997) 225.
35. A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1995) 1653.
36. N. Evrard-Todeschi, J. Gharbi-Benarous, C. Gaillet, L. Verdier, G. Bertho, C. Lang, A. Parent, J. P. Girault, *Bioorg. Med. Chem.* **8** (7) (2000) 1579.
37. L. Verdier, J. Gharbi-Benarous, G. Bertho, N. Evrard-Todeschi, P. Mauvais, J. P. Girault, *J. Chem. Soc. – Perkin Trans. II* **12** (2000) 2363.
38. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A* **110** (2006) 580.
39. N. Košutić-Hulita, D. Matak-Vinković, M. Vinković, P. Novak, G. Kobrehel, G. Lazarevski, *Croat. Chem. Acta*, **74** (2001) 327.
40. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, J. Plavec, G. Lazarevski, G. Burek, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 39.
41. G. Lazarevski, M. Vinković, G. Kobrehel, S. Đokić, B. Metelko, D. Vikić-Topić, *Tetrahedron* **49** (1993) 721.
42. J. Everet, J. W. Tyler, *J. Am. Chem. Soc. Perkin Trans* **2** (1987) 1659.
43. M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 6108.
44. J. Yan, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, E. R. Zartler, *J. Magn. Reson.* **163** (2003) 270.
45. O. Kooistra, L. Herfurth, E. Lüneberg, M. Frosch, T. Peters, U. Zähringer, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 573.
46. M. A. Johnson, B. M. Pinto, *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 295.

SUMMARY

Ligand-receptor Interactions by NMR Spectroscopy

P. Tepeš^a and P. Novak^b

Today NMR spectroscopy is a method of choice for elucidation of interactions between biomolecules and the potential ligands. Knowledge on these interactions is an essential prerequisite for the rational drug design. The most important contribution of NMR to drug design a few years ago was the 3D structure determination of proteins. Besides delivering the 3D structures of the free proteins as a raw material for the modeling studies on ligand binding, NMR can directly yield valuable experimental data on the biologically important protein-ligand complexes. In addition to X-ray diffraction, NMR spectroscopy can provide information on the internal protein dynamics or dynamics of intermolecular interactions. Changes in NMR parameters allow us to detect ("SAR by NMR") and quantitatively determine binding affinities (titration, diffusion NMR experiments, etc.) of potential ligands. Also, it is possible to determine the binding site and conformations of ligands, receptors and receptor-ligand complexes with the help of NMR methods such as tr-NOESY. Epitopes or functional groups responsible for binding of ligands to the receptor can be identified by employing STD or WaterLOGSY experiments. In this review are described some of the most frequent NMR methods for the characterization of the interactions between biomolecules and ligands, together with their advantages and disadvantages.

^a Environmental geochemistry laboratory, Faculty of Geotechnical Engineering, University of Zagreb, Hallerova aleja 7, 42 000 Varaždin, Croatia,

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Received January 24, 2007

Accepted July 5, 2007